蕨类植物染色体数目研究的好材料

王紫娟[1*]，向建英[2]，成晓[3]

（1. 大理大学 农学与生物科学学院，云南 大理 671003；2. 西南林业大学 云南生物多样性研究院，昆明 650224；3. 中国科学院昆明植物研究所 资源植物与生物技术重点实验室，昆明 650201）

摘要：染色体数目分析是现代系统与进化植物学研究十分重要和不可缺少的环节。在蕨类植物中，使用根尖或孢子母细胞作为实验材料的经典方法在取样时往往存在困难。该文以 3 种桫椤科桫椤属植物为例，探寻适合蕨类植物染色体数目研究的材料。由于取样时没有时间、季节和数量上的限制，我们推荐配子体作为蕨类植物染色体数目研究的实验材料。

关键词：桫椤属，染色体计数，桫椤科，配子体，实验材料

中图分类号：Q942.5; Q2-33 **文献标识码：A**

A good material for chromosome counts of ferns

WANG Zijuan[1*], XIANG Jianying[2], CHENG Xiao[3]

(1. *College of Agriculture and Biological Science*, *Dali University*, Dali 671003, Yunnan, China; 2. *Yunnan Academy of Biodiversity*, *Southwest Forestry University*, Kunming 650204, China; 3. *Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Abstract: Analysis of chromosome numbers is a very important and indispensable step in modern systematic and evolutionary botany research. In ferns, the classical methods using root tips or sporocytes as materials often have difficulties when sampling. In this paper, three species of *Alsophila* (Cyatheaceae) were taken as examples to explore the materials suitable for the study of chromosome numbers of ferns. As there are no time, season and quantitative restrictions in sampling, gametophytes are recommended as experimental materials for the study of chromosome numbers of ferns.

Key words: *Alsophila*, chromosome count, Cyatheaceae, gametophyte, experimental material

染色体数目分析是现代系统与进化植物学研究十分重要和不可缺少的环节。对于那些对分类、起源和进化感兴趣的植物学家来说，染色体数目分析是研究任何一类植物的一个基本环节（Guerra，2008）。植物体内的染色体数目能提供物种种内和种间遗传分化的信息，这有助于我们在各个分类等级上理解植物的系统发育关系（Windham & Yatskievych，2003；Glick & Mayrose，2014）。认识到染色体数目数据对植物系统进化研究的重要性，研究人员已经做了很多努力来尽可能多的确定物种和种群的染色体数目。

有花植物的染色体研究可以追溯到 19 世纪，而蕨类植物的染色体研究直到 20 世纪才开始，并且在最初的 20 年内只有不到 20 种蕨类的染色体数目被报道过，这一方面由于蕨类植

基金项目：国家自然科学基金（31500458）；云南省教育厅科学研究基金（2015C072Y）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31500458); Yunnan Province Education Department Scientific Research Fund（2015C072Y）]。

作者简介：王紫娟（1980-），女， 湖南邵阳人，博士，副研究员，主要从事生物多样性保护研究，（E-mail）wangzijuan@mail.kib.ac.cn。

[*]**通信作者**

物的染色体数目普遍高，并且染色体小，用传统的石蜡切片法很难进行准确的染色体计数（吴兆洪，1984；王任翔等，2007）；另一方面由于蕨类植物的根尖细胞含有坚硬的黏性物质，采用有花植物根尖水解的方法效果不理想，很难制作压制均匀、染色体清晰的玻片。因此，直到 1950 年 Manton 的书《Problems of cytology and evolution in the pteridophyta》（蕨类植物的细胞学和进化问题）出版后，蕨类植物的染色体准确计数才得以实现。Manton 采用孢子母细胞醋酸洋红压片技术来解决蕨类植物的染色体计数问题。蕨类植物的染色体研究虽然起步较晚，但发展速度比显花植物的快得多。在 Manton 的书出版之后的 20 年内，有 2000 多种蕨类植物的染色体数目被报道出来，占世界总蕨类植物的 20%（Walker，1973）。在 20 世纪 80 年代到 90 年代初，蕨类植物的染色体研究达到了高峰（王任翔等，2007），此后，相关的研究论文急剧减少。一方面，可能因为分子生物技术的快速发展，转移了科研人员的研究兴趣；另一方面，Manton 采用的孢子母细胞压片法也有一定的局限性，比如难以获取合适的孢子母细胞（邵文，2013）。邵文（2013）建议使用胚胎或幼孢子体进行蕨类植物的染色体研究，但从孢子到胚胎和幼孢子体的形成需要较长时间，会影响研究进展。因此，有必要为蕨类植物染色体数目研究寻找一种更加方便、更有效的实验材料。

本文以孢子来源的配子体为实验材料，以 3 种桫椤科（Cyatheaceae）桫椤属（*Alsophila*）蕨类为例，探讨配子体在蕨类植物染色体计数研究中的优势。

1 材料与方法

用于染色体计数的实验材料是用孢子培养出来的配子体。孢子可以从保存好的标本上收集或从活植物体上采集。

用于本实验研究的蕨类包括黑桫椤（*A. podophylla*）、大叶黑桫椤（*A. gigantea*）以及滇南桫椤（*A. austro-yunnanensis*）。2015 年，在云南南部的西双版纳热带植物园、小腊公路以及河口至屏边的公路旁分别收集它们的孢子（表 1），然后在实验室里将其播种于腐殖土中，进行配子体培养，当发育成幼原叶体或心型原叶体具有良好的分生组织后（约 1~3 周），用 0.002 mol·L^{-1} 的 8-羟基喹啉溶液预处理 3~5 h，用 Farmer's 固定液（95%乙醇：冰醋酸=3：1）在 4 ℃固定半小时以上，依次用 95%、70%和 50%酒精以及蒸馏水洗脱，然后用 1 N 盐酸在 60 ℃的水浴锅中解离 6~10 min，最后在 1%醋酸洋红中对配子体材料进行压片。

配子体有丝分裂细胞经过预处理、固定、解离、染色和压片后，用奥林巴斯 BX51 显微镜观察拍照。

2 结果与分析

染色体观察结果汇总于表 1。这三种蕨类的染色体都很分散，易于观察和计数，n=69（图 1）。

黑桫椤在中国的香港、台湾、贵州、云南、福建、广东、广西以及海南都有分布，另外也分布于日本、越南、老挝、泰国以及柬埔寨等国家（张宪春，2004）。早在 1965 年，Roy & Holttum 就对广东鼎湖山的黑桫椤材料进行了染色体数目报道；在 1989 年，Nakato 对分布于日本的黑桫椤进行了染色体研究，他们均以根尖为实验材料，发现黑桫椤为二倍体，报道其染色体数目分别为 2n=c.140 和 2n=138。我们以配子体为实验材料，观察到的结果与他们报道的一致，黑桫椤配子体的染色体数目为 n=69（图 1: A），黑桫椤为二倍体物种。

大叶黑桫椤分布于中国的云南、广东、广西以及海南，在日本的南部、马来半岛、老挝等东南亚国家以及印度等南亚国家也有分布（张宪春，2004）。早在 1954 年，Manton & Sledge 采用孢子母细胞醋酸洋红压片法对分布于南亚锡兰（现更名为斯里兰卡）的大叶黑桫椤进行了染色体数目研究，发现 n=69；在 1962 年，Abraham et al. 以根尖为实验材料，对分布于印度南部的大叶黑桫椤进行了染色体分析，得到 2n=138；在 1999 年，Kato & Nakato 同样

以根尖为实验材料，对采自中国海南的材料进行了染色体报道，2n=138。我们以配子体为实验材料，观察到 n=69（图 1: B），与他们报道的结果一致，大叶黑桫椤是一个有性二倍体物种。

滇南桫椤为中国特有种，主要分布在云南的屏边和麻栗坡（张宪春，2004）。本实验的研究材料采自屏边，此次为首次对其染色体数目进行报道。我们观察到滇南桫椤配子体的染色体数目为 n=69（图 1: C），它也是一个有性二倍体种。

3 讨论与结论

以孢子来源的配子体为实验材料，观察到黑桫椤和大叶黑桫椤的染色体数目与以往报道的采用根尖或孢子母细胞为材料的染色体结果一致，但利用配子体为实验材料的优势却是显而易见的。

对蕨类植物进行染色体研究时，通常采用根尖或孢子母细胞为实验材料，但根尖或孢子母细胞的生长活跃期非常有限，这就限制了取样时间，取样的困难阻碍了很多植物的细胞学研究。以孢子培养来源的配子体为实验材料，取样时间不限，只要给予适当的人工条件，孢子一年四季均可培养，配子体取样不受具体时间、季节影响。孢子可以从标本馆标本或活植物体上收集。如果储存得当，蕨类植物的孢子可以存活数十年（Windham & Haufler，1986）。此外，孢子培养配子体的技术非常简单，可以为研究人员提供足够多的样本材料进行细胞学研究，特别是对于那些难以判断根尖生长活跃状态或难以把握孢子母细胞产生精确时间的没有经验的人来说。通过孢子培养产生的配子体在一年中的任何时候都可以获得，打破了季节和时间的限制，减少了野外采样的工作量。这种方法在处理难于获得的蕨类植物时特别有利，例如桫椤科（Cyatheaceae）和碎米蕨类（Cheilanthoid ferns）植物。桫椤科植物是一类特殊的蕨类植物，具有树状根茎，1975 年被列入“濒危物种国际贸易公约”（CITES），是中国二级重点保护植物。野外直接挖取根尖会使这些物种在野外的生存受到极大的威胁。桫椤科是一个泛热带大科，全球分布着约 500 种现存物种（Tryon & Gastony，1975）；然而，到目前为止，被计算染色体的物种还不到 40 种。碎米蕨类通常分布于偏僻的地方很难成功移栽，孢子囊群小，并由毛发、鳞片和反折的叶边覆盖，很难获得适宜的根尖材料或孢子母细胞；在 Windham & Yatskievych（2003）以孢子萌发的配子体为实验材料进行细胞学研究之前，只有不到 20%的碎米蕨类染色体被报道出来。况且，蕨类植物根尖含有难以水解的黏性物质，同时蕨类植物的染色体小、数目多，很难获得染色体完全分散的装片，而蕨类植物的配子体只由一层细胞构成，易于压制，染色体数量是根尖细胞的一半，因而更容易被观察和统计。

Manton（1950）在她的书《Problems of cytology and evolution in the pteridophyta》（蕨类植物的细胞学和进化问题）中提到了这种方法，但除了 Roy & Manton（1965）、Gastony & Haufler（1976）、Windham & Haufler（1986）、Windham & Yatskievych（2003）、Dong（2011）外，很少有研究者利用配子体进行蕨类植物的细胞学研究。大多数研究仍然使用根尖或孢子母细胞作为蕨类细胞学研究的实验材料（卢金梅等，2006；Hsieh et al.，2008；Wang et al.，2011；王任翔等，2013)。

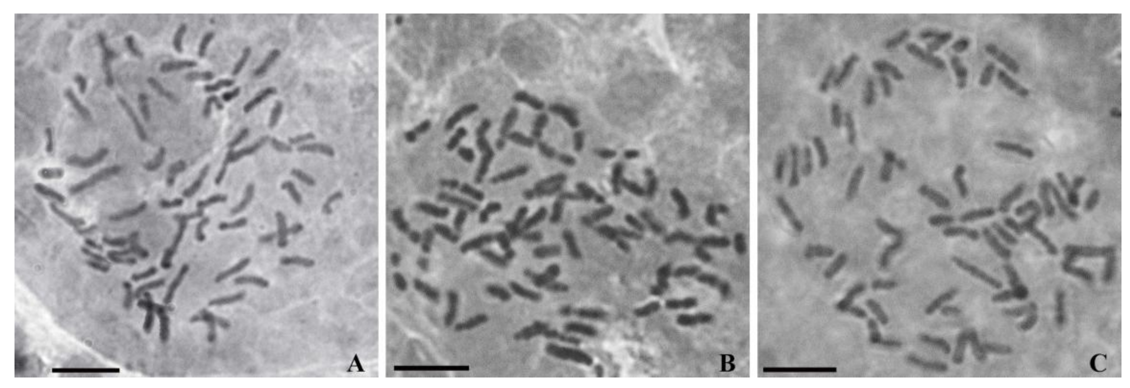
基于本文介绍的3种蕨类所取得的积极结果，以及所提到的众多优点，我们强烈推荐将配子体作为蕨类植物的细胞学研究材料。采用孢子萌发的配子体为实验材料，可以弥补根尖或孢子母细胞取样的不足。

表1 3种桫椤属植物的采样地点和染色体数目

Table1 Chromosome number and localities of three *Alsophila* species

物种 Taxon	采样地点 Locality	染色体数目 Chromosome	图示 Fig.1

		number (n)	
黑桫椤 *Alsophila podophylla* (Hook.) Copel.	西双版纳热带植物园 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden	69	A
大叶黑桫椤 *A. gigantea* Wall. ex Hook.	西双版纳小腊公路92公里处 Xiaola highway 92 km point, Xishuangbanna	69	B
滇南桫椤 *A. austro-yunnanensis* S. G. Lu	河口至屏边的公路3公里处 Hekou 3 km point way to Pingbian	69	C



A. 黑桫椤；B. 大叶黑桫椤；C. 滇南桫椤。标尺=10 μm。

A. *Alsophila podophylla*, n=69; B. *A. gigantea*, n=69; C. *A. austro-yunnanensis*, n=69. Scale bars =10 μm.

图1 3种桫椤属植物的配子体有丝分裂中期染色体

Figs.1 Photographs of metaphase chromosomes of gametophytes in three species of *Alsophila*

参考文献：

ABRAHAM A, NINAN CA, MATHEW PM, 1962. Studies on the cytology and phylogeny of the pteridophytes. Ⅶ. Observations on one hundred species of South Indian ferns [J]. J Indian Bot Soc, 41 (3): 339-421.

DONG SY, 2011. Taxonomic studies on *Asplenium* sect. *Thamnopteris* (Aspleniaceae) I: Cytological observations [J]. Am Fern J, 101 (3): 156-171.

GASTONY G, HAUFLER CH, 1976. Chromosome numbers and apomixes in the fern genus *Bommeria* (Gymnogrammaceae) [J]. Biotropica, 8 (1): 1-11.

GLICK L, MAYROSE I, 2014. ChromEvol: assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny [J]. Mol Bio Evol, 31 (7): 1914-1922.

GUERRA M, 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications [J]. Cytogenet Genom Res, 120 (3-4): 339-350.

HSIEH TH, CHANG YH, CHIOU WL, et al, 2008. Chromosome numbers of five species of the Marattiaceae in Taiwan [J]. Taiwan J For Sci, 23 (4): 377-381.

KATO M, NAKATO N, 1999. A cytotaxonomic study of Hainan (S. China) pteridophytes, with notes on polyploidy and apogamy of Chinese species [M]// ZHANG XC, SHING KH. Ching Memorial Volume. Beijing: China Forestry Publishing House: 1-19.

LU JM, LI DZ, WU D, 2006. Chromosome numbers of four genera in the Dryopteridaceae [J]. Acta Phytotax Sin, 44 (5): 516-522. [卢金梅, 李德珠, 吴丁, 2006. 鳞毛蕨科四个属的染色体数目（英文）[J]. 植物分类学报, 44 (5): 516-522.]

MANTON I, 1950. Problems of cytology and evolution in the Pteridopyhta [M]. Cambridge:

Cambridge University Press.
MANTON I, SLEDGE WA, 1954. Observations on the cytology and taxonomy of the pteridophyte flora of Ceylon [J]. Phil Tr R Soc London Ser B, n 654 238: 127-185.
NAKATO N, 1989. Cytological studies on the genus *Cyathea* in Japan [J]. J Jpn Bot, 64 (5): 142-147.
ROY SK, HOLTTUM RE, 1965. Cytological observations on ferns from Southern China [J]. Am Fern J, 55 (4): 154-158.
ROY SK, MANTON I, 1965. A new base number in the genus *Lygodium* [J]. New Phytol, 64 (2):286-292.
SHAO W, 2013. Cytological methods in fern by using embryo and young sporophyte [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 33 (2):407-410.[邵文, 2013. 利用胚胎和幼孢子体进行蕨类细胞学研究 [J]. 西北植物学报, 33 (2):407-410.]
TRYON RM, GASTONY GJ, 1975. The biogeography of endemism in the Cyatheaceae [J]. Fern Gazette, 11 (2/3): 73-79.
WALKER TG, 1973. Evidence from cytology in the classification of ferns [J]. JERMR AC et al., The phylogeny and classification of ferns. Bot J Linn Soc, 67 (Suppl. 1): 91-110.
WANG RX, LU SG, DENG XC, 2007. Cytotaxonomic studies of the Chinese pteridophytes: A review[J]. Acta Phytotax Sin, 45 (1): 98-111. [王任翔, 陆树刚, 邓晰朝, 2007. 中国蕨类植物细胞分类学研究概况 [J]. 植物分类学报, 45 (1): 98-111.]
WANG RX, SHAO W, LU SG, et al, 2011. Cytotaxonomic Study of 12 Species in the Polypodiaceae from Southern China [J]. Am Fern J, 101 (4): 307-316.
WANG RX, LIU L, SHAO W, et al, 2013. Cytotaxonomic study on two species of the *Arthropteris* from Guangxi, China [J]. Guihaia, 33 (6): 723-726. [王任翔, 刘灵, 邵文, 等, 2013. 广西爬树蕨属两种植物的细胞分类学研究 [J]. 广西植物, 33 (6): 723-726.]
WINDHAM MD, HAUFLER CH, 1986. Biosystematic uses of fern gametophytes derived from herbarium specimens[J]. Am Fern J, 76 (3):114-128.
WINDHAM MD, YATSKIEVYCH G, 2003. Chromosome studies of Cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthoideae) from the western United States and Mexico [J]. Am J Bot, 90 (12): 1788-1800.
WU SH, 1984. A survey of cytology in the pteridophyta [J]. Guihaia, 4 (1): 1-8. [吴兆洪, 1984. 蕨类植物细胞学概说 [J]. 广西植物, 4 (1): 1-8.]
ZHANG XC, 2004. Cyatheaceae [M]. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press, 6(3): 249-274.[张宪春, 2004. 桫椤科 [M]. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 6 (3): 249-274.]